



TITLE:

## VII. 共同利用研究, 2.研究成果, (3)一般グループ研究

AUTHOR(S):

---

CITATION:

VII. 共同利用研究, 2.研究成果, (3)一般グループ研究. 霊長類研究所年報 2017, 47: 113-116

ISSUE DATE:

2017

URL:

<http://hdl.handle.net/2433/236444>

RIGHT:

availability, activity budget and core area of Malaysian long-tailed macaques (*Macaca fascicularis*) and dusky langurs (*Trachypithecus obscurus*) in dipterocarp forest edges. I was able to utilize the PRI journal library for references. I went back to Malaysia on 4th October 2016 after staying in PRI for 20 days. Currently, the project is still in progress with collaborator and my sensei/co-supervisor, Dr. Ikki Matsuda. A PhD thesis (under Universiti Kebangsaan Malaysia, Malaysia) is being written as one of the output of this research grant.

#### 2016-B-99 ヤクシマザルの頬袋散布種子および糞中種子の二次散布者調査

松原幹（中京大・国際教養） 所内対応者：辻大和

ヤクシカやげっ歯類などが、ニホンザルが糞散布した種子の生存率におよぼす影響を調べるため、2016年5-7月と10-12月に、屋久島西部地域のニホンザルの糞中種子、および頬袋散布種子に集まる生物を、自動撮影カメラで調べた。ヤマモモの種子は5月末から6月上旬の結実前半期において頬袋散布は極めて少なく、糞散布が中心であった。収集したサル糞からヤマモモ種子を摘出・水洗い・着色し、直径3mm以上の種子を除去して20gずつ小分けにした糞に100粒ずつ埋め直して人工サル糞を作成した。それらの人工サル糞に鉄製の覆い（シカ除けカゴ、小動物除けカゴ、センチコガネ類除けカゴ）を被せ、着色種子と無着色種子とともに林内の実験区に設置し、3日後、1週間後、1ヶ月後に実験区内に残った種子数を比較した。自動撮影カメラは1ヶ月間設置した。人工糞では設置から24時間以内に、ヤクシカが訪れてサル糞を食べる行動が、カメラトラップ場所の90%以上で確認され、森林性齧歯類による被食も撮影された。また、秋はイヌガシ、シロダモ、モッコク、リュウキュウマメガキの頬袋散布種子を収集し、同様の実験を行った。シロダモとイヌガシの頬袋散布種子は1ヶ月後の消失率が低く、シカによる被食は撮影されなかった。モッコクではサルが頬袋から出した直後の種子をシカが採食する行動が直接観察・ビデオ記録された。リュウキュウマメガキについては、現在映像を確認中である。

#### 2016-B-100 口腔における感覚受容機構の解明

城戸瑞穂、合島怜央奈（佐賀大学） 所内対応者：今井啓雄

適切な口腔感覚は、哺乳・摂食・情報交換など多様な行動の基盤となっている。しかしながら、その機構についての理解はまだ限られたものである。私たちは、(狭義の)味覚とされる甘味・塩味・酸味・苦味・うまみ以外の口腔内の感覚、とくに、温度感覚や唐辛子や胡椒などのスパイスなどの感覚、触圧感覚などの機構の解明を目指し、こうした広義の味覚とされる感覚の分子基盤として、TRPチャネル(transient receptor potential channel)を想定し研究を進めてきた。そして、口腔粘膜上皮に、温度および機械受容への関与が報告されているTRPチャネルの霊長類における発現と感覚神経との関係を明らかにすることを目指し、本研究を実施している。平成28年度は研究室を異動し、さらに移動先の研究棟の改修工事のため実験が十分にできない環境にあった。顕微鏡の環境など思いの外体制整備に手間取った。ゆえに、試料の収集と実験条件の検討を主に行った。また新たな抗体作製を行ったので免疫染色のための条件検討を行った。抗体が標的タンパクを認識していると思われたが、バックグラウンドも高かったことから、さらに条件検討を進めているところである。

### C. 一般グループ研究

#### 2016-C-1 植物の機能形質に基づくニホンザルの食物選択メカニズムの解明

饗庭正寛（東北大学大学院生命科学研究所）、黒川紘子（森林総合研究所） 所内対応者：湯本貴和

辻ら(2011)に示された、野生ニホンザルの採食する木本植物リストと自然環境保全基礎調査植生調査、および代表研究者らが収集した日本の主要樹木の形質データを用いて、ニホンザルの生息域全域において、ニホンザルが好む樹種(採食の報告例4例以上)とそれ以外の樹種の形質を比較した。ニホンザルの樹種選択に影響しうる形質として、最大樹高、葉の面積あたり重量、葉の強度、葉の含水率、葉の窒素含量、葉のタンニン含量、葉のフェノール含量、葉のリグニン含量に着目した。落葉樹では、ほぼすべての気温帯で、サルが好む樹種の最大樹高はそうでない樹種より有意に高かった(図1)。ただし、この傾向がサルの嗜好性によるものか、観察のバイアスによるものかは、今回の解析では不明である。また、サルが好む樹種では、葉の面積あたり重量、葉の強度、葉の窒素含量、葉のタンニン含量が広い気温帯で有意に高かった。一方、常緑樹では、サルが好む樹種において、葉の面積あたり重量、葉の強度、葉のリグニン含量が高い傾向がしばしば見られた(図2)。葉の面積あたり重量は摂食効率、窒素含量は栄養価の面から嗜好性に影響している可能性が考えられるが、一般に被食防衛に関する形質である、タンニン含量や葉の強度に高い傾向が見られたのは意外な結果であった。

#### 2016-C-2 福島市に生息する野生ニホンザルの放射能被曝影響調査

羽山伸一、近江俊徳（日獣大・獣医）、中西せつ子（NPO どうぶつたちの病院）、名切幸枝、石井奈穂美（日獣大・獣医） 所内対応者：川本芳

本研究グループでは、2007年から福島県ニホンザル特定鳥獣保護管理計画にもとづき福島市で個体数調整のために捕獲された野生個体を分析し、妊娠率の推定や遺伝子解析などを行ってきた。福島市にはおよそ20群、2000頭の野生群が生息しているが、2011年の福島第1原子力発電所の爆発により放射能被曝した。2012年度に放射性セシウムの蓄積状況と血液性状の関係を調査し、血球数やヘモグロビン濃度などの低下を明らかにした。今年度は、その後の筋肉中放射性セシウムの蓄積状況と血液性状を調査し、放射性物質の減衰に伴う血液性状の変化を明らかにした。

2016年度は、134個体のニホンザルを回収し、セシウム濃度および血液検査を実施した。セシウム濃度は、年々漸減傾向にはあるものの、冬季に数百ベクレル/kgと比較的高い数値を示す個体がいた。また、血液検査値は、昨年度同様に正常範囲を下回る個体が多く、2012年度に対照とした青森県のサルとの平均値と比較して、有為に低下していることが今年度も確認された。

また、将来における中長期的な影響評価を可能にするため、採取した臓器及び遺伝子等の標本保存を行った。

#### 2016-C-4 サル造血免疫機能の解析とサル免疫不全ウイルス感染モデルマウスの樹立

岡田誠治(熊本大・エイズ学研究センター)、俣野哲朗(国立感染症研・エイズ研究センター)、刈谷龍昇、塚本徹雄(熊本大・エイズ各研究センター) 所内対応者：中村克樹

本研究の目的は、ニホンザルの造血・免疫系を解析し、その特徴を明らかにすること、その結果を元にニホンザルの造血免疫系を構築したマウスモデルとエイズモデルを構築することである。そこで、ニホンザルの骨髓を採取し、CD34の発現を様々な抗ヒトCD34抗体を用いて確認した。その結果、Clone561, 563はニホンザル骨髓では交差反応が認められたが、cloneQBEnd-10, 8G12では認められなかった。そこで、Clone561を用いてCD34陽性細胞をImmunomagnetic beads法により分離し、コロニーアッセイを行った。その結果、CD34陽性細胞からのコロニー形成が確認できた。また、CD34陽性細胞を放射線照射した高度免疫不全マウス(NMJマウス)新生仔肝に移植したが、ニホンザルによる造血系の再構築は認められなかった。一方、ニホンザル末梢血単核球をPHA-Pで刺激後、サル免疫不全ウイルス(Simian Immunodeficient virus: SIV)を感染させたところ、感染が成立した。

#### 2016-C-5 アカゲザル iPS 細胞の免疫細胞への分化

金子新(京都大・iPS細胞研)、塩田達雄、中山英美(大阪大・微生物研)、三浦智之(京都大・ウイルス研)、入口翔一(京都大・iPS細胞研) 所内対応者：明里宏文

本研究は、iPS細胞から各種免疫細胞への分化誘導方法を確立し、そしてそれらの免疫細胞の自家移植によりヒト免疫不全症候群などによる破綻した免疫機構を再構築することを、免疫学的にヒトに近縁な霊長類を用いて検討することを目的とした研究である。

3頭のアカゲザル末梢血T細胞から樹立した10種のiPS細胞クローンから、OP9DL1細胞との共培養によりT細胞分化能ならびに増殖能およびエフェクター機能が確認できたクローンを各アカゲザルあたり1クローン選出した。自家移植を目的として、各種ウイルスベクターによるGFP遺伝子導入を検討し、ボルナウイルスベクターによるアカゲザルiPS細胞への効率の良いGFP遺伝子導入を確認した。(ボルナウイルスベクターは京都大学ウイルス研究所の朝永研究室から提供された。)

HIV遺伝子の感染性に関与する標的遺伝子をノックアウトするためのiPS細胞上でのゲノム編集の準備を進め、またiPS細胞由来の造血細胞およびT細胞の自家移植に向けて、移植の前処置と投与経路に関する調査を行うなど、実験準備を進めた。

#### 2016-C-7 金華山島のサル・個体数の変動と6群間の生態社会学的比較

伊沢純生(NGO宮城のサル調査会)、杉浦秀樹(京都大・野生動物)、藤田志歩(鹿児島大・共同獣医・行動生理・生態学)、宇野壮春(合同会社東北野生動物保護管理センター)、川添達朗(京都大・理学・人類進化論)、関健太郎、三木清雅(合同会社東北野生動物保護管理センター) 所内対応者：古市剛史

申請時の本研究の目的は6つで、その結果は以下の通りである。①個体数の一斉調査は申請通り2回、秋と冬に実施した。結果は秋が269頭、冬が266頭だった。②群れごとのアカンボウの出生数と死亡(消失)数は、春の調査を上記2回の一斉調査に加えて実施。出生数は6群で計39頭、死亡(消失)数は8頭、1年以内の死亡率は0.21だった。③家系図と④食物リスト作成は群れごとの担当者が随時実施した。⑤6群間の比較生態・社会学的調査は、群れの頭数が100頭を超えたD群を対象に分派行動や群れの分裂に関して集中的に実施した。⑥サル学を志す若手への可能な研究テーマの整理は、宮城のサル調査会の機関紙『宮城県のニホンザル』で、一昨年の第28号、昨年の第29号に引き続き、第30号を現在準備中である。

ところで、上記の⑤および昨年度(2015年度)の報告書で述べたD群の分裂についてだが、分裂した小さい方(分裂群)は、これまでの金華山サル個体群での5回の分裂で見られた群れの遊動域を二分するという形でなく、島の北東部に新たな遊動域を構えているものと予測して追跡調査を実施した。しかし島の分裂群は存在せず、D群から分かれたメス4頭とコドモたちの小集団がB2群に半ば追従しながら生活していた。その詳細は目下整理中である。

#### 2016-C-8 ニホンザルを対象とした顔認識システムの開発

大谷洋介(大阪大・未来戦略機構第一)、小川均(立命館大・情報理工) 所内対応者：半谷吾郎

本研究ではニホンザルを対象とした広範かつ簡便な個体識別・登録手法の実現により調査・保護管理・獣害対策等の効率的な実施に資することを目的として、画像取得による顔認識システムの開発を実施した。

霊長類研究所で飼育されているニホンザル集団のうち、高浜群(57個体)、若桜群(45個体)、嵐山群(62個体)、椿群(47個体)を対象として、定期検診時に頭部を15種の角度から撮影した。撮影した動画から静止画を

抽出しプログラムに登録するためのサンプル画像とした。

画像中からニホンザルの顔領域を自動的に抽出するために、HOG 特徴量を用いた強化学習(Real AdaBoost)を利用した識別器の作成を行った。抽出した顔画像から「標準化された顔の要素」の集合である固有顔(Eigenface)を作成し、固有顔と各画像との差分を既知の全個体のデータベースと照合することにより個体識別を行った。

実際に野生下で運用可能な、十分な精度および登録可能頭数を持ったシステムの構築のためにはさらなるサンプル画像が必要であり、今後追加の画像サンプルの取得を行うとともに、データベース登録手法の簡略化および識別精度向上のためのプログラム改良を実施していく。同時に、飼育個体を対象として「実際に野外で撮影される動画」を想定した撮影を行い、試作システムの検証・改善を行うとともに、算出された一致率がどの水準であれば同一個体と断定できるのか、基準の策定を行う。

#### 2016-C-9 プロポフォールとフェンタニルによるコモンマーモセットの全静脈麻酔法の確立

牟田佳那子(東京大学農学生命科学科獣医科学研究室)、増井健一(防衛医科大・病院麻酔)、矢島功(防衛医科大学校病院・薬剤) 所内対応者: 宮部貴子

静脈麻酔薬のプロポフォールとオピオイド系鎮痛薬とを静脈投与し、全身麻酔状態と鎮痛を得る全静脈麻酔法である。揮発性麻酔薬と比較して頭蓋内圧や循環動態に与える影響が小さく、脳機能研究に供される機会の多いコモンマーモセットに同麻酔法は有益であると予想し、今回実施に必要な薬物動態学的情報を得るためプロポフォールの薬物動態解析を実施した。

1-3 歳のオスのコモンマーモセット 6 頭を使用した。セボフルラン鎮静下で尾静脈から 8mg/kg のプロポフォールを 4mg/kg/min の速度で静脈投与し、投与後 2、5、15、30、60、90、120、180 分到大腿静脈から 0.6ml の採血を実施した。血漿から液体高速クロマトグラフィー蛍光検出法で血中濃度を測定し、薬物動態解析ソフトウェアを用い薬物動態解析を実施した。採血は 1 回の実験で上記 8 時点のうちいずれか 2 点でのみ実施し、2 ヶ月毎に計 4 回繰り返すことで実験動物倫理規定を遵守した。

本報告書作成時点で血中濃度の測定が終了している 24 点で薬物動態を実施したところ、薬物動態モデルは 2 コンパートメントモデルが最も適していた。今回の投与量では有意な呼吸抑制が認められたが、心拍数への影響は認められなかった。全ての血中濃度の測定が終了し次第、再度薬物動態解析を実施、得られた情報を基に全身麻酔のための投与速度や投与量等をシミュレーションする予定である。

#### 2016-C-10 マカクにおける繁殖季節性と運動のおよぼす骨格加齢への影響

松尾光一(慶應大・医・細胞組織)、山海直(医薬基盤・健康・栄養研究所・霊長類医学研究センター)、Suchinda Malaivijitnond(Chulalongkorn 大)、森川誠(慶應大・医)、Pomchote Porrawee(Chulalongkorn 大)

所内対応者: 濱田穰

ヒトは通年繁殖性であるのに対し、ニホンザルは季節繁殖性を示す。ニホンザルでは毎年、繁殖期と非繁殖期に性ホルモンが増減する。性ホルモン濃度の観点からは、ヒトでいえば、年ごとに若年と老年を行き来するような状態であるといえる。しかし、ニホンザルの骨密度が毎年増減するかどうかは知られていない。今回、我々はニホンザルにおいて、最小の骨である耳小骨と、最大の長管骨(大腿骨など)の骨密度が、季節に伴いどのように変動するかを解析した。

まず、個体ごとのさらし骨標本から、オス 75 頭分、メス 71 頭分の耳小骨と大腿骨を選別した。死亡時の骨量や骨密度は、骨の標本化を経て保存されていると仮定し、マイクロ CT を使って骨量と骨密度を定量した。死亡時の日付や年齢から季節変化を解析したところ、オスでは、ツチ骨と大腿骨の骨密度が季節性変動を示した。次に、生体オス 14 頭の橈骨遠位端を、繁殖期と非繁殖期に末梢骨用の定量的 CT 装置(pQCT)で測定し、さらに 12 頭の血中テストステロン濃度および 8 頭の血中 25-(OH)ビタミン D3 も繁殖期・非繁殖期で定量した。これらから、オスのニホンザルでは、骨量や骨密度が「生殖と連動した季節性の変動」を示すことが示唆された。

#### 2016-C-11 異種生体環境を用いたチンパンジーiPS 細胞からの臓器作製

中内啓光(東京大・医科所)、長嶋比呂志(明治大・農)、平林真澄(生理学研究所)、正木英樹、海野あゆみ、佐藤秀征(東京大・医科所) 所内対応者: 今井啓雄

チンパンジー 3 個体の末梢血の提供を受け、それぞれについてセンダイウィルスを用いて transgene-free iPSC を樹立した。樹立した iPSC 細胞にキメラ形成に望ましいと考えられる細胞死阻害処理あるいはナイーブ化処理を施し、マウス胚に移植検討を行った。ただし、ナイーブ化に関してはヒト iPSC に同様の処理を施した場合とは遺伝子発現プロファイルが異なる面があり、ナイーブ化が達成できていない可能性がある。ナイーブ化については多くの手法が報告されており、どの手法が適用できるかは今後も更に検討を続ける必要がある。これらの細胞株をマウス胚に移植し、どの株が高頻度にキメラ形成できるか検証を進めている段階である。また、ブタ胚への移植準備も整い、pilot study を終えたところであり、平成 29 年度は本格的にチンパンジー細胞-ブタキメラ作製に取り組む予定である。これらの結果をまとめ、平成 29 年度中にも成果を論文発表・学会報告する予定である。

#### 2016-C-12 霊長類由来 ex vivo 培養系を用いた消化管細胞機能の解析

岩根健、高橋信之(東京農業大学・応生・食品安全健康)、佐藤幸治(岡崎統合バイオ)、栗飯原永太郎(シン



シナティール大学・医)、大木淳子、熊木峻佑、難波みつき(東京農業大学・応生・食品安全健康)

所内対応者: 今井啓雄

本研究の目的は、霊長類から腸管オルガノイドを作製し、*ex vivo*において食品因子などに対する腸管細胞の応答性を解析することである。霊長類から腸管オルガノイドを作製することにより、げっ歯類では解析不能であったヒトに近い細胞でのアッセイが可能となると考えられる。

前年度までにアカゲザルの腸管よりオルガノイドの作製に成功したが、継代すると細胞は増えず、げっ歯類とは異なる培養条件や継代条件を確立する必要性が生じていた。そこで、平成28年度では、ニホンザルの腸管を出発材料に様々な実験条件を設定することで、霊長類に適した培養方法や継代法を見いだすことに成功した。具体的には、培地に添加する Wnt3a の活性や BSA の種類により、霊長類腸管オルガノイドの増殖活性が変化することが明らかとなった。げっ歯類腸管オルガノイドは Wnt3a や BSA の添加を必要とせず、霊長類オルガノイドを培養する際に注意すべき点である。また、継代法に関しては、Trypsin を使い単一細胞にする方法にて継代が安定した。これもシリンジ等を使い物理的にクリプトを分離するするげっ歯類オルガノイドの継代法とは異なる点である。現在、増殖活性の強いオルガノイドから最終分化した細胞を効率よく誘導させるため様々な培養条件を検討している。

#### D. 随時募集研究

##### 2016-D-1 サルの脅威刺激検出に関する研究

川合伸幸(名古屋大・院・情報科学) 所内対応者: 香田啓貴

ヒトがヘビやクモに対して恐怖を感じるのには生得的なものか経験によるのか長年議論が続けられてきた。我々は、ヘビ恐怖の生得性は認識されていることを示すために視覚探索課題を用いて、ヒト幼児や(ヘビを見たことのない)サルがヘビの写真をはかの動物の写真よりもすばやく検出することをあきらかにし、ヒトやサルが生得的にヘビに敏感であることを示した。しかし、ヘビをすばやく検出する視覚システムは、ヘビのカモフラージュを見破れるようにできているのかは不明である。我々はヒト成人は、ほかの動物に比べてノイズを混ぜた写真からヘビを正確に認識できることを示した。このことをサルで検証した。4頭で見本合わせ課題を習得させた。1頭はまだ見本合わせ課題の習得段階である。3頭でテストが終了した。見本刺激と2つの選択肢を対応させる課題で、グローブテストとして、見本刺激にさまざまな量(10-50%)のノイズを混ぜてどれだけ認識できるかを調べたところ、1頭はノイズが多くなってもヘビの認識がもっともすぐれたが、別の1頭はむしろヘビの認識がもっとも劣った。残りの1頭のヘビの認識率は中間であった。見本刺激と選択刺激を直接対応させる課題でははっきりした結果は得られなかった。そこで、H29年度は見本刺激を消した後に選択肢を提示し、記憶と照合する課題でヘビの認識がすぐれるかを検証する。

##### 2016-D-3 Connecting the dots: linking host behaviour to parasite transmission

Julie Dubosq (KUWRC) 所内対応者: Andrew MacIntosh

Investigating infectious disease dynamics is important for managing health of livestock, wildlife, and humans, as well as species/habitat conservation, public health and economic issues. For this project, we studied simian foamy virus (SFV) and *Escherichia coli* infection patterns in Japanese (and Rhesus) macaques to understand: 1/ factors determining intensity, prevalence and diversity of pathogens in relation to individual and social network characteristics, and 2/ infection risk and transmission pathways of pathogens within social networks. We focused on socially-transmissible parasites that are endemic and relatively host-specific. They are of low virulence but nevertheless monopolize host resources and are not without fitness consequences. These organisms further provide a good model to examine transmission dynamics. Initially, we planned to conduct the study at Koshima, but data collection proved too complicated for a one-year project. During a short visit, we collected a few fecal samples and have stored them at the Primate Research Institute for reference. Instead, we switched our focus to captive macaques at KUPRI where I collected behavioural and biological samples on two social groups. We are now establishing SFV and *E. coli* genetic profiles for each host, and matching them to individual (age, sex) and social (centrality in aggression and grooming networks) characteristics to determine transmission pathways. Preliminary data show that 56/58 adults (>4yo), 30/34 juveniles (1-4yo) and 7/22 infants (<1yo), as well as 63/75 females and 30/39 males tested positive for SFV. Preliminary data on 15 Rhesus and 16 Japanese macaques showed that dyads that groomed more and that were of similar age shared more similar virus strains than others, whereas aggression frequency, kinship, or dominance rank did not seem to affect strain similarity. These effects may be linked to 1/ a higher risk of transmission between individuals in frequent active body contact and 2/ natural viral strain evolution, some strains existing predominantly in some years but not in others. This research can inform animal population management and welfare as well as give insight into evolutionary pressures on sociality and parasitism in animal groups.

##### 2016-D-4 レトロエレメント由来の獲得遺伝子の霊長類における分布解析

石野史敏(東京医歯大・難研)、金児-石野知子(東海大・健康科学)、李知英(東京医歯大・難研)、入江将仁(東京医歯大・難研、東海大・健康科学) 所内対応者: 古賀章彦

ヒトゲノムにはレトロエレメント由来の獲得遺伝子群である11個のSIRH遺伝子が含まれる。これらの多くは真獣類特異的の遺伝子であり、近年の研究から、ヒトやマウスを含む真獣類の個体発生機構の様々な特徴(胎生や高度の脳機能など)に深く関係する機能を持つことが明らかになってきた。そのため、真獣類の進化を促した遺